

# ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК В ГИАЛУРОНОВОМ ГИДРОГЕЛЕ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

DOI: 10.17691/stm2017.9.4.13

УДК 576.314.6/.7:612.11:616.831.001.6–001

Поступила 12.05.2017 г.



**А.В. Балябин**, к.м.н., научный сотрудник отдела нейрохирургии<sup>1</sup>;

**О.П. Тихобразова**, к.б.н., старший научный сотрудник отдела экспериментального моделирования ЦНИЛ<sup>2</sup>;

**А.А. Гладков**, младший научный сотрудник лаборатории нейроинженерии Центра трансляционных технологий<sup>3</sup>;

**М.С. Муравьева**, аспирант<sup>3</sup>;

**М.С. Муравьева**, аспирант<sup>3</sup>;

**Е.А. Клюев**, ординатор кафедры лучевой диагностики ФПКВ<sup>2</sup>;

**И.В. Мухина**, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ<sup>2</sup>; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова<sup>2</sup>;

профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>3</sup>;

руководитель Центра трансляционных технологий<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр Минздрава России, Н. Новгород, 603155, Верхне-Волжская набережная, 18;

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

<sup>3</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

**Цель исследования** — оценить возможности трансплантации аутологичных нейральных прогениторных клеток обонятельной выстилки мышей линии C57BL/6 в гидрогеле на основе низко-, средне- и высокомолекулярной гиалуроновой кислоты при проведении реконструктивной операции после открытой черепно-мозговой травмы (ЧМТ) в эксперименте.

**Материалы и методы.** На модели открытой ЧМТ мышей линии C57BL/6 проведена реконструктивная терапия с использованием аутологичных нейральных прогениторных клеток обонятельной выстилки мышей в гидрогеле на основе высоко-, средне- и низкомолекулярной гиалуроновой кислоты через 7 дней после травмы. Кратковременные и долговременные нарушения неврологических функций и памяти вследствие ЧМТ оценивали, используя серию поведенческих и когнитивных тестов (модифицированная шкала оценки выраженности неврологического дефицита, тест «открытое поле», а также тест распознавания нового объекта и условный рефлекс пассивного избегания). Для визуализации очага повреждения использовали высокопольную магнитно-резонансную томографию.

**Результаты.** Имплантация нейральных прогениторных клеток в гидрогеле на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты в отличие от средне- и низкомолекулярной оказывало протекторное действие, снижая неврологический дефицит и восстанавливая моторные функции, кратковременную и долговременную память в посттравматическом периоде. Влияние молекулярной массы гидрогеля гиалуроновой кислоты при трансплантации аутологичных нейральных прогениторных клеток после ЧМТ на морфологические характеристики очага повреждения было менее эффективным.

**Заключение.** Трансплантация аутологичных нейральных прогениторных клеток обонятельной выстилки мышей линии C57BL/6 в гидрогеле на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты в очаг повреждения после открытой травмы мозга способствует функциональному восстановлению рефлекторной и когнитивной деятельности животных в посттравматическом периоде.

**Ключевые слова:** аутологичные нейральные прогениторные клетки; гиалуроновая кислота; черепно-мозговая травма; ЧМТ; функциональное восстановление.

**Как цитировать:** Balyabin A.V., Tikhobrazova O.P., Gladkov A.A., Muravyova M.S., Klyuyev Y.A., Mukhina I.V. Transplantation of neural progenitor cells in hyaluronic hydrogel in traumatic brain injury in experiment. Modern Tehnologies in Medicine 2017; 9(4): 106–114, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.13>

## English

## Transplantation of Neural Progenitor Cells within Hyaluronic Acid Hydrogel in Traumatic Brain Injury in Experiment

A.V. Balyabin, MD, PhD, Researcher, Neurosurgery Department<sup>1</sup>;

Для контактов: Тихобразова Ольга Павловна, e-mail: [olga.tikhobrazova@gmail.com](mailto:olga.tikhobrazova@gmail.com)

**O.P. Tikhobrazova**, PhD, Senior Researcher, Experimental Modeling Department, Central Research Laboratory<sup>2</sup>;  
**A.A. Gladkov**, Junior Researcher, Laboratory of Neuroengineering, Center for Translational Technologies<sup>3</sup>;  
 Junior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Central Research Laboratory<sup>2</sup>;  
**M.S. Muravyova**, PhD Student<sup>3</sup>;  
**Y.A. Klyuyev**, Intern, Department of Radiodiagnostics, Faculty of Advanced Medical Training<sup>2</sup>;  
**I.V. Mukhina**, DSc, Professor, Head of the Central Research Laboratory<sup>2</sup>; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov<sup>2</sup>; Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>3</sup>; Chief of the Translation Technologies Center<sup>3</sup>; Leading Researcher of Biotechnologies Group<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Privolzhsky Federal Research Medical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, 18 Verkhne-Volzhskaya naberezhnaya, Nizhny Novgorod, 603155, Russian Federation;

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

<sup>3</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

**The aim of the study** was to evaluate the possibilities of transplantation of autologous neural progenitor cells from C57BL/6 mouse nasal olfactory lamina propria in the hydrogel based on low-, medium-, and high-molecular weight hyaluronic acid during a reconstructive operation after an open traumatic brain injury (TBI) in experiment.

**Materials and Methods.** A reconstructive therapy was performed on the model of an open traumatic brain injury using the autologous neural progenitor cells from C57BL/6 mouse nasal olfactory lamina propria in a hydrogel based on high, medium and low molecular weight hyaluronic acid 7 days after injury. Short-term and long-term impairments of neurological functions and memory due to TBI were assessed using a series of behavioral and cognitive tests (modified Neurological Severity Score (mNSS)), open field test, novel object recognition test and passive avoidance behavior). High-field magnetic resonance tomography was used for visualization of a lesion cavity.

**Results.** Implantation of autologous neural progenitor cells in the hydrogel based on high-molecular weight hyaluronic acid in contrast to low- and medium-molecular weight had a protective effect reducing neurological deficit and restoring motor functions, short-term and long-term memory in the posttraumatic period. The effect of hydrogel molecular weight on the morphological characteristics of the injury cavity was less effective during the autologous neural progenitor cells transplantation after TBI.

**Conclusion.** Transplantation of autologous neural progenitor cells from C57BL/6 mouse nasal olfactory lamina propria in the hydrogel based on high-molecular weight hyaluronic acid into the injury focus after open brain trauma promotes functional recovery of reflex and cognitive behavior of animals in the posttraumatic period.

**Key words:** autologous neural progenitor cells; hyaluronic acid hydrogel; traumatic brain injury; TBI; functional recovery.

Лечение последствий черепно-мозговой травмы (ЧМТ) и ряда других нейродегенеративных процессов является одной из наиболее сложных, социально значимых проблем медицины, поскольку в большинстве случаев приводит к инвалидизации и снижению когнитивного потенциала организма [1, 2]. Отсутствие существенных успехов медикаментозной терапии [3], ограниченная возможность нейрогенеза во взрослом организме [4] обуславливают необходимость изучения фундаментальных механизмов восстановления поврежденных участков головного мозга и разработки принципиально новых методов лечения ЧМТ. Актуальным направлением работ является разработка адекватных носителей для трансплантируемых клеток, которые бы создавали определенное микроокружение при длительном процессе восстановления нейронных сетей и структуры ткани [5–7].

В настоящее время работы в области нейротрансплантации в большей степени сфокусированы на использовании гидрогелевых систем различного состава с прогениторными клетками. Во-первых, пористая структура гидрогеля позволяет клеткам и питательным веществам проникать в матрикс, а продуктам жизне-

деятельности клеток — выводиться в объем организма [8]. Во-вторых, гидрогелевые системы оптимальны с точки зрения механической совместимости с тканями головного и спинного мозга. Совместимость механических характеристик является определяющей при дифференцировке прогениторных клеток [9] и влияет на успех имплантации в целом [10]. В-третьих, гидрогели служат перспективными носителями лекарственных соединений в место травмы.

Внеклеточный матрикс мозга состоит из молекул, синтезируемых и секретируемых нейронами и глияльными клетками, которые в различных сочетаниях формируют стабильные агрегаты в межклеточном пространстве [11]. Наиболее выраженные и изученные скопления молекул внеклеточного матрикса в ЦНС — это перинеурональные сети [12]. Они богаты гиалуроновой кислотой (ГК), хондроитин сульфат протеогликанами и белками, соединяющими эти компоненты (link proteins). ГК, являясь каркасом внеклеточного матрикса во внеклеточном пространстве мозга, участвует в регуляции клеточной дифференциации, миграции, пролиферации клеток и ангиогенеза. Перисинаптический матрикс, включающий ГК, может создавать барьеры

для диффузии синаптических молекул в мембране и таким образом содействовать компартиментализации синаптического механизма передачи сигнала.

Кроме того, ГК может образовывать гидрогели, которые не только содержат большое количество воды, способствующей жизнеспособности клеток, но и обладают биофизическими, биохимическими свойствами, аналогичными свойствам тканей организма. Кроме того, гиалуроновые гидрогели являются биологически совместимыми. Однако их использование для нейротрансплантации пока недостаточно развито.

**Цель исследования** — оценить возможности трансплантации аутологичных нейральных прогениторных клеток в гидрогеле низко-, средне- и высокомолекулярной гиалуроновой кислоты при проведении реконструктивной операции после открытой черепно-мозговой травмы в эксперименте.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на 10–12-недельных мышах-самцах линии C57BL/6 массой 20–22 г (n=60). Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в руководстве «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (ILAR publication, 1996, The National Academies Press), в Национальном стандарте РФ — ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)», и были согласованы с Этическим комитетом НижГМА.

**Гидрогель на основе гиалуроновой кислоты.** Гидрогель, который использовался для нейротрансплантации, представлял собой стерильный 1% водный раствор гиалуроната натрия (НПП «Тульская индустрия ЛТД», Россия) с различной молекулярной массой действующего вещества: низкомолекулярная форма — 55,0 кДа; среднемолекулярная форма — 500,0 кДа и высокомолекулярная форма — 1250,0 кДа. Вспомогательными веществами служили натрия хлорид — 8,5 мг и фосфатный буфер — 320 мкг на 1 мл раствора.

**Получение и культивирование прогениторных клеток.** Нейральные прогениторные клетки получали из обонятельной выстилки мышей линии C57BL/6 в соответствии с ранее разработанным протоколом [13].

**Моделирование открытой черепно-мозговой травмы.** ЧМТ способом «weight-drop» по оригинальной методике [14] наносили путем падения груза с тупой поверхностью, что обеспечивает ускорение движения головой при минимальном локальном воздействии в точке приложения травмирующей силы. Использование данной модели наиболее полно воспроизводит клиническую картину очагового повреждения, в том числе ушиба головного мозга, и позволяет изучать помимо локальных травматических изменений, сопровождающиеся вторичной гибелью нервных клеток в отдаленных отделах мозга, чувствительных к травме, таких как гиппокамп, зубчатая извилина, зрительный бугор, а также оценивать грубые двигательные нарушения, изменения тонкой координации движений, дефицит когнитивных функций.

Перед нанесением травмы под 1,5% изофлурановым наркозом животных фиксировали в стереотаксической установке для мышей Narishige (Narishige, Япония). Голову животного прижимали к стальной пластине для избежания перелома челюсти и достижения горизонтального расположения свода черепа к торцевому участку груза. Затем на коже головы, свободной от шерсти, делали разрез и производили трепанацию фрезой костей черепа (d=4 мм, Bregma 2 мм). Твердая мозговая оболочка оставалась неповрежденной. Груз, представляющий собой стальной цилиндр, поднимали на заданную высоту, затем сбрасывали, нанося удар по области трепанационного окна (диаметр ударной части, соответствующей трепанационному окну, — 4 мм; масса груза — 4 г; высота поднятия груза — 0,80 м). После нанесения травмы в подлежащем мозговом веществе возникали повреждения в виде разрыва твердой мозговой оболочки, образования очагов геморрагического ушиба или разможнения мозгового вещества, характерные для тяжелой ЧМТ. После операции кожу животных ушивали, шов обрабатывали антисептическим раствором.

В ходе эксперимента животные случайным образом были разделены на группы: 1-я группа — интактные животные (n=10); 2-я группа — ложнооперированные животные (n=10); 3-я группа — контрольная (PBS) (n=10); 4-я группа — имплантация прогениторных клеток в гидрогеле высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (ГК «D»); 5-я группа — имплантация прогениторных клеток в гидрогеле гиалуроновой кислоты средней молекулярной массы (ГК «E») (n=10); 6-я группа — имплантация прогениторных клеток в гидрогеле гиалуроновой кислоты низкой молекулярной массы (ГК «K») (n=10).

Мышам контрольной и опытных групп на 7-е сутки после моделирования ЧМТ в очаг повреждения имплантировали PBS (30 мкл) или ГК с клетками (30 мкл) соответственно. В группе ложнооперированных животных проводили те же процедуры (анестезия, трепанация костей черепа), за исключением моделирования ЧМТ и трансплантации. Мыши интактной группы не подвергались анестезии, моделированию ЧМТ и трансплантации.

Морфофункциональные параметры оценки трансплантации клеток на изучаемых носителях *in vivo* основывались на визуализации целостности ткани мозга с помощью МРТ и тестирования неврологических и когнитивных функций мышей.

**Оценка неврологического дефицита.** Для оценки динамики посттравматических неврологических нарушений функций головного мозга животных была использована модифицированная для мышей шкала оценки выраженности неврологического дефицита (modified neurological severity score — mNSS) [15–18].

Эта шкала включает оценку 10 клинических параметров, характеризующих двигательные функции, удержание равновесия и некоторые поведенческие реакции животных (настороженность, поисковое по-

ведение). Невозможность выполнения животным одной из предусмотренных задач оценивают в 1 балл. Максимально возможное количество баллов — 10 (невозможность выполнить все задачи), минимально возможное — 0 (успешное выполнение всех задач).

Определение неврологического статуса у мышей проводили ежедневно с 1-х по 10-е сутки посттравматического периода, а также на 15, 20, 25 и 30-е сутки. Для вычисления исходного уровня у всех групп животных за сутки до моделирования ЧМТ определяли неврологический статус [15–18].

**Тест «открытое поле».** Анализ общего двигательного и исследовательского поведения животных проводили за 4 дня до моделирования ЧМТ (исходный уровень), затем на 10-е и 30-е сутки посттравматического периода. Животное помещали в центр поля (установка Open Field LE800S; PanLab/Harvard Apparatus, Испания; Stoelting Co., США) и вели за ним наблюдение. Освещенность площадки во время опыта составляла 200 лк.

С целью определения нарушений ориентировочно-исследовательской и двигательной активности животных в течение 5 мин регистрировали следующие показатели поведенческой активности крыс: горизонтальную двигательную активность — пройденное расстояние (см); длительность двигательной активности в центре и на периферии (с); скорость двигательной активности (см/с); вертикальную двигательную активность — количество стоек/подъемов на задние лапы; продолжительность (с) и количество реакций замиранья; продолжительность (с) и количество реакций груминга.

Видеорегистрацию отдельных поведенческих реакций животных осуществляли с помощью видеокамеры SONY SSC-G118 (Япония). Регистрацию и анализ данных контролировали программой Smart v. 3.0.03. (PanLab Harvard/Apparatus, Испания; Stoelting Co., США).

**Условный рефлекс пассивного избегания.** Для функциональной оценки нарушений процессов обучения у животных на 10-е сутки посттравматического периода вырабатывали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) [19]. Установка Shuttle Box LE895 (PanLab/Harvard Apparatus, Испания; Stoelting Co., США) состояла из камеры (46×27×25 см) с электрифицированным решетчатым полом, разделенной на два отсека скользящей дверцей. Для электрической стимуляции использовали источник с фиксированным сопротивлением LE100/26 (PanLab/Harvard Apparatus, Испания; Stoelting Co., США). Подачу электрокожного раздражения, положение дверки между отсеками и латентное время перехода в темный отсек, измеряемое с момента помещения животного в светлый отсек камеры, контролировали программой Shutavoid v. 1.8.03 (PanLab/Harvard Apparatus, Испания; Stoelting Co., США). Регистрировали латентное время перехода в темный отсек камеры при открытой дверке между отсеками. Тест заканчивали, когда животное всту-

пало в темный отсек или не делало этого в течение 3 мин. Функции долговременной памяти изучали, оценивая сохраненность у мышей УРПИ через 24 ч (на 10-е сутки).

**Тест распознавания нового объекта.** Для исследования нарушений функций непространственной гиппокампопосредованной кратковременной памяти применяли тест распознавания нового объекта. Он состоял из трех этапов: привыкание, обучение и тестирование [20, 21]. На 23-и и 24-е сутки после моделирования ЧМТ животных помещали в центр квадратной arenas (45×45×40 см) (LE802S; PanLab/Harvard Apparatus, Испания; Stoelting Co., США) на 10 мин для привыкания и уменьшения стресса — животные исследовали пустую арену. На 24-е сутки на арену помещали два одинаковых объекта. Мышей помещали в центр поля на 10 мин для исследования объектов (обучение). Через 24 ч животных снова помещали в центр arenas с одним знакомым объектом и одним новым для регистрации исследовательского поведения в течение 10 мин (тестирование).

В ходе эксперимента на этапах обучения и тестирования регистрировали совокупное время исследования знакомого и нового объектов. Исследовательское поведение включало реакции принюхивания (направление носа к объекту на расстоянии не более 2 см, касание объекта). Во время обучения и тестирования памяти поведение животных считали исследовательским, если реакции по отношению к объектам составляли не менее 10 с. Видеорегистрация отдельных поведенческих актов поведения животных осуществлялась с помощью видеокамеры SONY SSC-G118. Регистрацию и анализ данных контролировали программой Smart v. 3.0.03. Состояние функций памяти определяли как дискриминационное время исследования нового объекта (DIR) по формуле  $DIR = \left( \frac{\text{доля времени исследования знакомым объектом}}{\text{доля времени исследования новым объектом}} \right) \times 100$  [17].

**Магнитно-резонансная томография.** МРТ головного мозга мышей выполнена на высокопольном магнитно-резонансном томографе DD2-400 9.4 T (400 MHz) (Agilent Technologies, США) с объемной катушкой M2M (H<sup>1</sup>). Мониторинг физиологических параметров животных (температура, дыхание, ЭКГ) во время томографии проводили на оборудовании фирмы SA Instruments, Inc. (США) с использованием программы PC-SAM. Животные находились под изофлюрановым наркозом. Подогрев животных осуществляли теплым воздухом с температурой 37°C.

Для получения T2\*-взвешенных изображений была использована импульсная последовательность MGEMS (multi echo multi slice, «многослойное эхо») с параметрами: время повторения — 1300 мс, время появления эха — 8 мс, количество случаев эха — 8, количество накоплений — 4, количество срезов — 15, толщина одного среза составляла 1 мм, поле зрения — 20×20 мм<sup>2</sup>,



размер матрицы — 128×128 пикселей. Общая длительность последовательности равнялась 8 мин 32 с.

**Статистический анализ.** Полученные результаты оценивали с использованием теста на нормальность выборочных распределений *W*-критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены в виде  $M \pm SEM$ . Полученные данные были обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0. Для анализа повторных измерений временной динамики и эффекта трансплантации использовали парный критерий Вилкоксона. Для оценки межгрупповых различий применяли критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

**Оценка неврологического статуса животных в посттравматическом периоде.** Анализ полученных результатов исследования показал, что у всех групп животных на 1-е сутки после моделирования ЧМТ согласно шкале оценки неврологического статуса развивалось выраженное повреждение головного мозга (рис. 1). Уровень неврологического дефицита статистически значимо отличался от соответствующих показателей интактной группы и группы ложнооперированных мышей ( $p < 0,05$ ).

Для всех животных было характерно асимметричное поведение вследствие наличия парезов конечностей с контралатеральной относительно очага поражения стороны, нарушения двигательных реакций, невозможности выполнения реакций, связанных с поддержанием

равновесия и координации движений, что свидетельствует о повреждении моторной коры головного мозга, среднего мозга и варолиева моста. Наблюдалась сложность при выполнении рефлекторных навыков, также связанная с повреждением среднего мозга и коры.

Во всех группах животных с имплантированием через 7 сут после ЧМТ в очаг повреждения суспензии прогениторных клеток в гидрогеле ГК неврологический дефицит уменьшался к 10-м суткам посттравматического периода, однако статистически значимых различий с контрольной группой не выявлено ( $p > 0,05$ ).

На 20-е сутки посттравматического периода в группе с имплантированием в очаг повреждения суспензии прогениторных клеток в гидрогеле ГК «D» наблюдалась тенденция к уменьшению у животных неврологического дефицита ( $p > 0,05$ ).

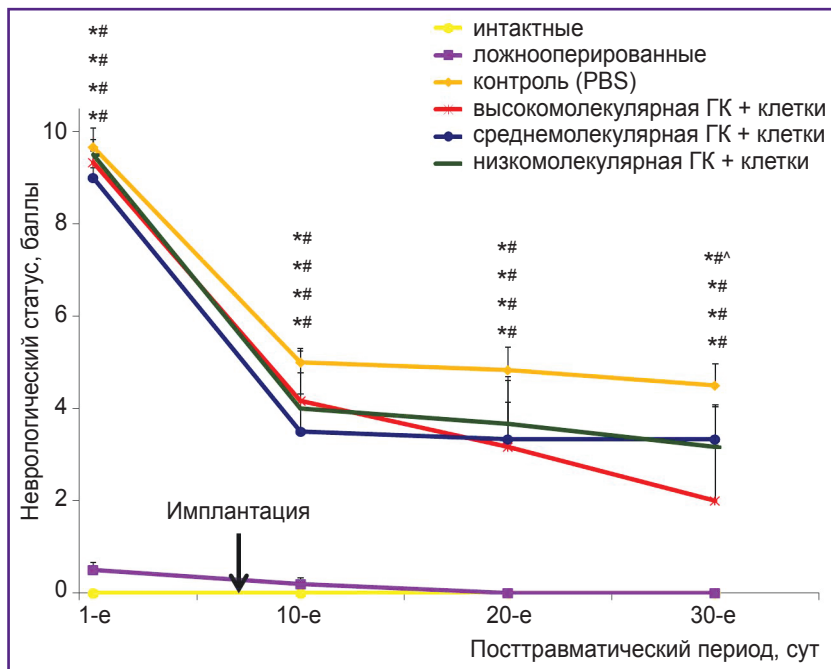
К 30-м суткам в этой группе неврологический статус мышей статистически значимо улучшался и отличался от показателя контрольной группы ( $p < 0,05$ ), в отличие от групп с имплантированием в очаг повреждения на 7-е сутки посттравматического периода нейральных клеток в гидрогелях ГК «E» и ГК «K». Следует отметить, что на протяжении всего наблюдаемого посттравматического периода неврологические функции у животных с ЧМТ полностью не восстанавливались, отмечались парезы на контралатеральной к очагу повреждения стороне и частичное ослабление рефлекторных реакций (поисковое поведение). Уровень неврологического дефицита был статистически значимо выше по сравнению с интактной группой и группой ложнооперированных животных.

Тест «открытое поле». Предварительное (до ЧМТ) тестирование животных не выявило различий между группами по основным поведенческим показателям.

**Тест «открытое поле».** Предварительное (до ЧМТ) тестирование животных не выявило различий между группами по основным поведенческим показателям.

ЧМТ приводила к нарушению структуры поведения животных, происходило снижение двигательной и исследовательской активности в сравнении с исходным уровнем, а также с показателями интактной и ложнооперированной групп животных ( $p < 0,05$ ). Восстановления ориентировочно-исследовательского поведения не происходило ни в одной из групп мышей с ЧМТ.

К 10-м суткам посттравматического периода в группе с имплантированием в очаг повреждения нейральных клеток в гидрогеле ГК «D» происходило восстановление скорости двигательной активности животных. Данный показатель был статистически значимо больше, чем в контрольной группе, но не отличался как от показателей интактной и лож-



**Рис. 1.** Динамика изменения неврологического статуса мышей линии C57BL/6 в посттравматическом периоде

Статистически значимая разница значений ( $p < 0,05$ ): \* — с интактной группой, критерий Манна–Уитни; # — с группой ложнооперированных животных, критерий Манна–Уитни; ^ — с контрольной (PBS) группой, критерий Манна–Уитни;  $n = 10$  в каждой группе

нооперированной групп, так и от других опытных групп с ЧМТ ( $p>0,05$ ) (рис. 2).

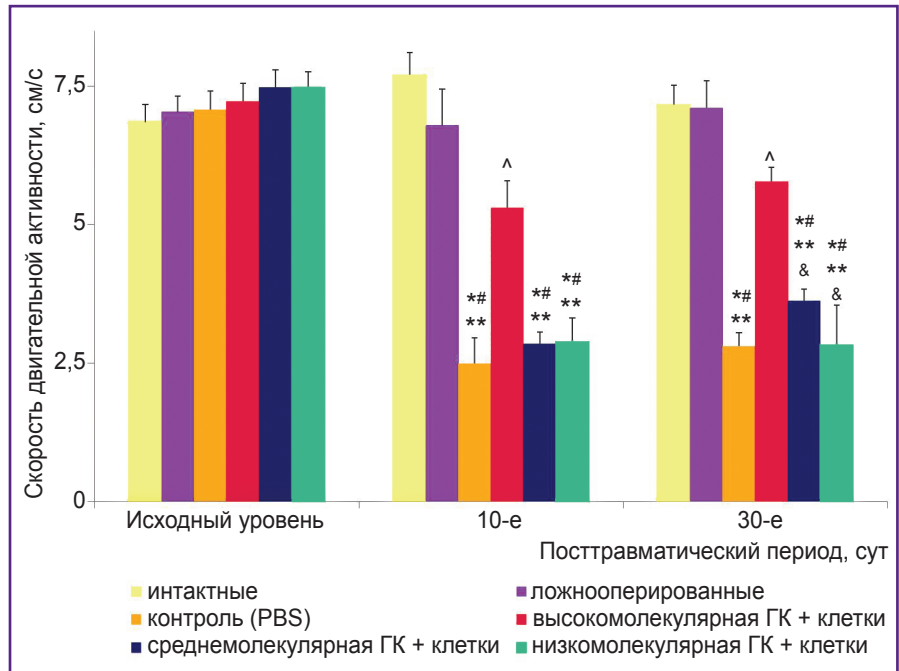
На 30-е сутки посттравматического периода скорость двигательной активности в этой группе была статистически значимо больше, чем в контроле, что свидетельствует о восстановлении у животных данной группы двигательных реакций и функций, связанных с поддержанием равновесия.

В группе мышей с имплантацией суспензии нейральных клеток в гидрогеле ГК «Е» скорость реакций не отличалась от контроля (PBS). В группе с введением в очаг повреждения суспензии клеток в гидрогеле ГК «К» скорость двигательной активности также не восстанавливалась и была статистически значимо меньше, чем в группе с имплантацией нейральных клеток в гидрогеле ГК «D».

**Условный рефлекс пассивного избегания.** Результаты поведенческих тестов свидетельствовали о нарушении у животных способности к обучению вследствие ЧМТ головного мозга. Во время сеанса обучения у мышей в контрольной группе латентное время перехода статистически значимо превышало аналогичные показатели в интактной группе и у ложнооперированных животных ( $p<0,05$ ), что обусловлено нарушением моторных функций ЦНС в результате ЧМТ.

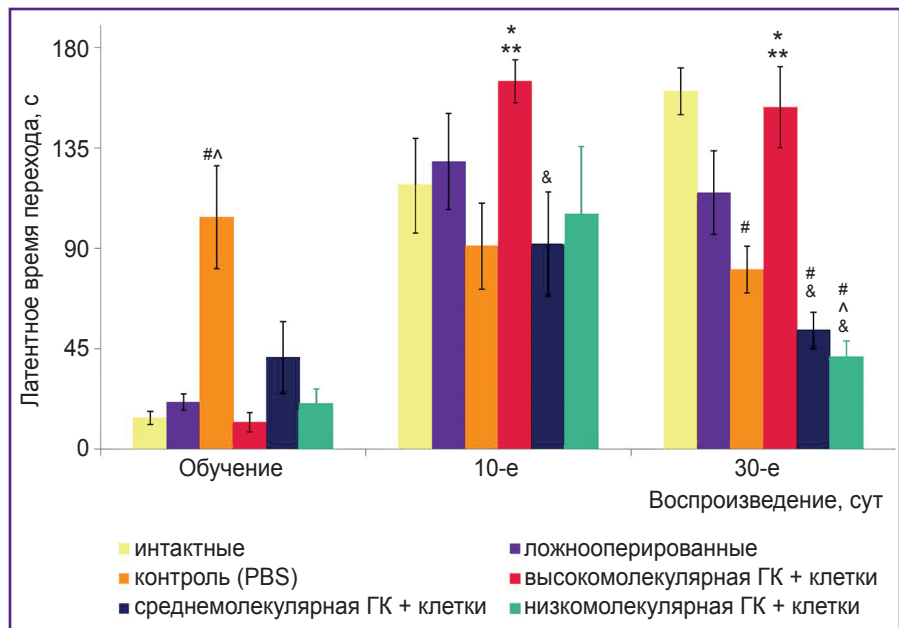
На 10-е сутки посттравматического периода в группе животных с имплантацией в очаг повреждения нейральных прогениторных клеток в гидрогеле ГК «D» так же, как в интактной группе и у ложнооперированных животных, латентное время перехода в темный отсек камеры статистически значимо увеличивалось по отношению к значению времени при обучении ( $p<0,05$ ), а кроме того, было статистически значимо больше, чем в контроле ( $p<0,05$ ) (рис. 3).

В группах с введением в очаг повреждения через 1 нед по-



**Рис. 2.** Динамика изменения скорости двигательной активности мышей линии C57BL/6 в посттравматическом периоде

Статистически значимая разница значений ( $p<0,05$ ): \* — с исходным значением, критерий Вилкоксона; # — с интактной группой, критерий Манна–Уитни; \*\* — с группой ложнооперированных животных, критерий Манна–Уитни; ^ — с контрольной (PBS) группой, критерий Манна–Уитни; & — с группой высокомолекулярной ГК + клетки, критерий Манна–Уитни; n=10 в каждой группе



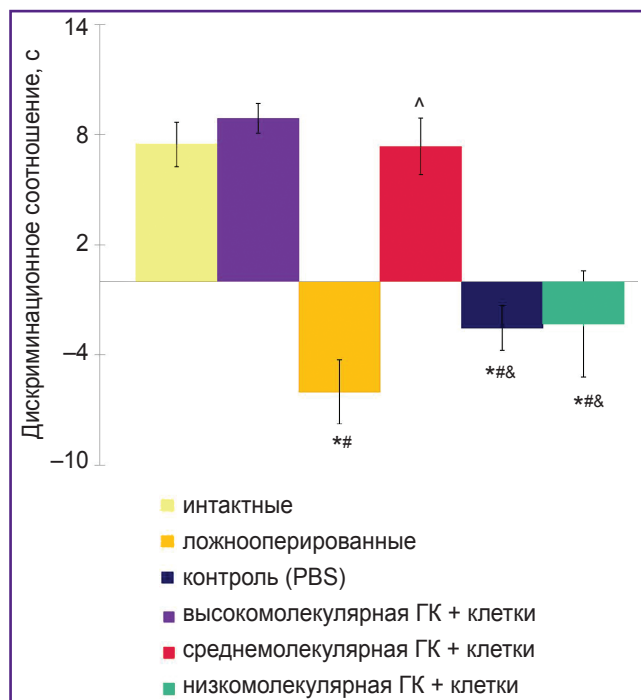
**Рис. 3.** Исследование способности к обучению и воспроизведению условной реакции пассивного избегания мышей линии C57BL/6 в посттравматическом периоде

Статистически значимая разница значений ( $p<0,05$ ): \* — со временем при обучении, критерий Вилкоксона; # — с интактной группой, критерий Манна–Уитни; ^ — с группой ложнооперированных животных, критерий Манна–Уитни; \*\* — с контрольной (PBS) группой, критерий Манна–Уитни; & — с группой высокомолекулярной ГК + клетки, критерий Манна–Уитни; n=10 в каждой группе

сле ЧМТ суспензии прогениторных клеток в гидрогеле средне- и низкомолекулярной ГК латентное время перехода при воспроизведении УРПИ на 10-е сутки не отличалось от времени при обучении ( $p>0,05$ ). Следует отметить, что в группе с имплантацией клеток в гидрогеле низкомолекулярной ГК латентное время перехода в это же время было статистически значимо меньше, чем в группе с имплантацией клеток в гидрогеле высокомолекулярной ГК ( $p<0,05$ ).

Функции долговременной памяти мышей оценивали по способности животных к воспроизведению УРПИ на 30-е сутки посттравматического периода. В группе мышей с имплантацией в очаг повреждения прогениторных клеток в гидрогеле ГК «D» латентное время перехода в темный отсек камеры статистически значимо превышало время контрольной группы ( $p<0,05$ ) и было больше латентного времени перехода при обучении ( $p<0,05$ ).

В группах с трансплантацией нейральных клеток в средне- и низкомолекулярном гидрогеле ГК латентное время перехода на 30-е сутки посттравматического периода, так же, как и в контроле, было статистически значимо меньше аналогичного показателя в интактной группе ( $p<0,05$ ) и в группе с имплантацией прогениторных клеток в гидрогеле высокомолекулярной ГК ( $p<0,05$ ).



**Рис. 4. Исследование функций кратковременной памяти у мышей линии C57BL/6 в посттравматическом периоде**  
 Статистически значимая разница значений ( $p<0,05$ ): \* — с интактной группой, критерий Манна–Уитни; # — с группой ложнооперированных животных, критерий Манна–Уитни; ^ — с контрольной (PBS) группой, критерий Манна–Уитни; & — с группой высокомолекулярной ГК + клетки, критерий Манна–Уитни;  $n=10$  в каждой группе

Таким образом, имплантация через 7 сут после моделирования ЧМТ в очаг повреждения прогениторных клеток в гидрогеле ГК «D» оказывало оптимизирующее действие на способность животных к обучению УРПИ на 10-е сутки и к актуализации следов долговременной памяти в отдаленном периоде.

**Тест распознавания нового объекта.** Результаты исследования показали, что моделирование ЧМТ у животных приводит к значительным нарушениям гиппокамповозависимой кратковременной памяти. Дискриминационное соотношение исследования в контрольной группе с введением в очаг повреждения раствора PBS было статистически значимо меньше показателей в интактной группе и у ложнооперированных животных ( $p<0,05$ ) (рис. 4).

В группах мышей с имплантацией через 1 нед после ЧМТ в очаг повреждения прогениторных клеток в гидрогеле ГК «D» время исследования нового объекта на этапе тестирования превышало время исследования знакомого объекта. Дискриминационное соотношение длительности исследования не отличалось от соотношения времени в интактной и ложнооперированной группах животных ( $p>0,05$ ), но в то же время статистически значимо превышало показатель контрольной группы ( $p<0,05$ ), что свидетельствует о восстановлении функций CA1–CA3-полей гиппокамповозависимой кратковременной памяти распознавания.

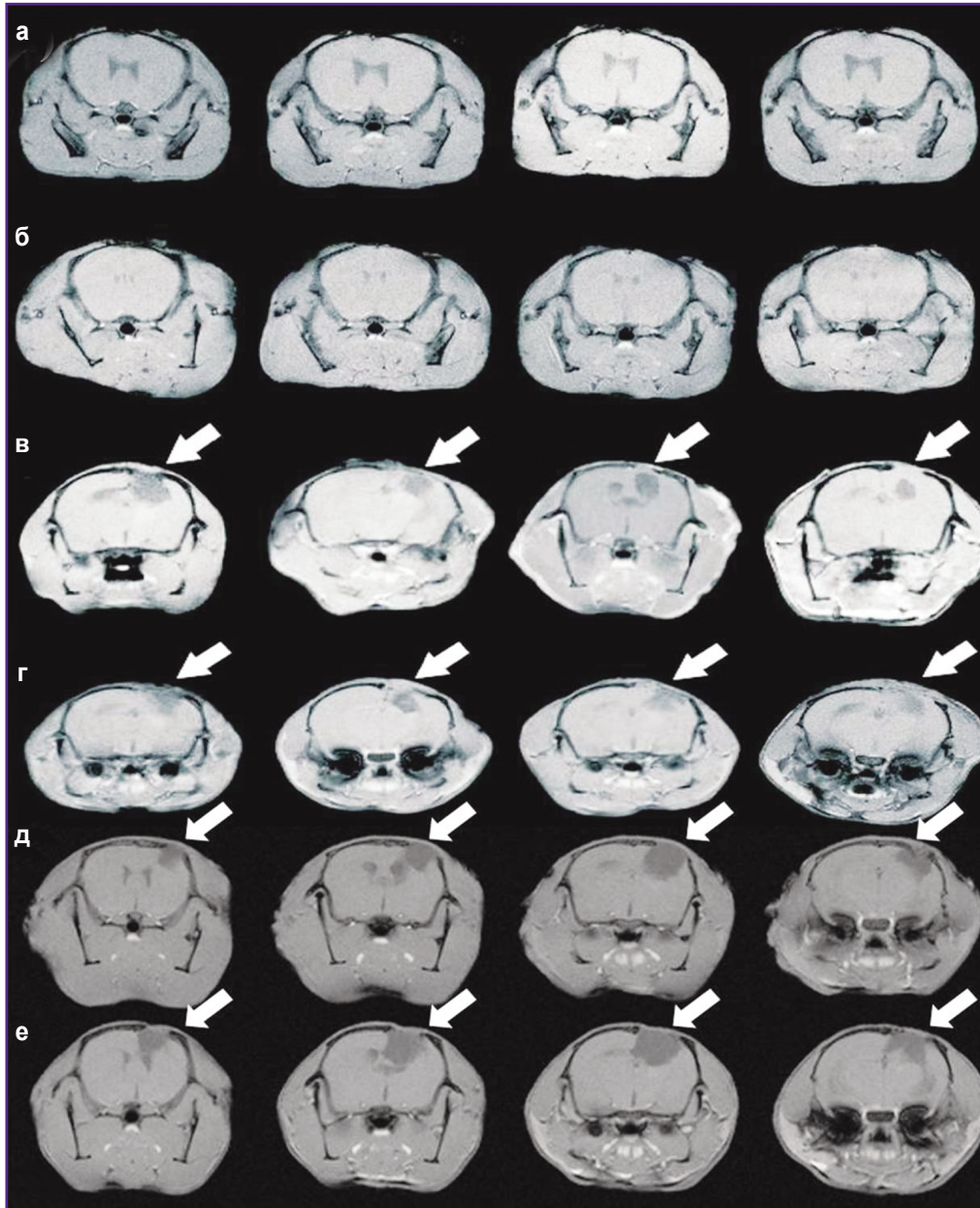
В группах мышей с введением через 7 сут после моделирования ЧМТ нейральных клеток в гидрогеле средне- и низкомолекулярной ГК дискриминационное соотношение длительности исследования, напротив, не отличалось от контрольного значения ( $p>0,05$ ) и было статистически значимо меньше аналогичного показателя в группе с имплантацией клеток в гидрогеле высокомолекулярной ГК, а также в интактной и ложнооперированной группах ( $p<0,05$ ).

**MPT-исследование.** Данные морфометрии на 30-е сутки, полученные при исследовании ткани мозга методом MPT, показали, что в группах с введением в очаг повреждения суспензии нейральных клеток в гидрогеле ГК разной молекулярной массы объем очага повреждения статистически значимо не отличался от контроля ( $p>0,05$ ) (рис. 5).

В группе с имплантацией клеток в гидрогеле ГК «D» на магнитно-резонансных томограммах головного мозга мыши очаг размозжения ткани к 30-м суткам визуализируется в виде дефекта на поверхности полушария, в то время как на МРТ головного мозга мышей с введением клеток в гидрогеле ГК «E» отмечается дефект ткани округлой формы в области сенсомоторной коры. На томограммах головного мозга мышей с введением нейральных клеток в гидрогеле ГК «K» визуализируется кистообразное образование округлой формы, с неровными краями, заполненное жидкостью в области сенсомоторной коры.

Таким образом, при моделировании ЧМТ у животных происходят развитие неврологического дефицита, нарушение двигательного и когнитивного поведе-





**Рис. 5. МРТ-изображения срезов головного мозга на 30-е сутки:**

*а* — intactных мышей; *б* — ложнооперированных мышей; *в* — мышей с инъекцией в очаг повреждения PBS-раствора; *г* — мышей с имплантируемыми в очаг повреждения клетками в высокомолекулярном гиалуроновом гидрогеле; *д* — мышей с имплантируемыми в очаг повреждения клетками в среднемoleкулярном гиалуроновом гидрогеле; *е* — мышей с имплантируемыми в очаг повреждения клетками в низкомолекулярном гиалуроновом гидрогеле; T2\*-взвешенные изображения получены с использованием импульсной последовательности MGEMS; *стрелка* — указана область травмы

ния. Имплантация через 7 сут после ЧМТ в очаг повреждения нейральных прогениторных клеток в гидрогеле высокомолекулярной ГК, в отличие от введения суспензии клеток в гидрогеле средне- и низкомолекулярной ГК, оказывает протекторное действие, восстанавливая синаптическую пластичность нейронов головного мозга (коры, гиппокампа), лежащую в основе моторных функций, процессов обучения

и памяти. Установлено оптимизирующее действие трансплантации нейральных прогениторных клеток в гидрогеле ГК на способность животных к обучению УРПИ на 10-е сутки и к актуализации следов кратковременной и долговременной памяти в отдаленном периоде. Влияние трансплантации на морфологические параметры ткани мозга на месте поврежденной области при травме менее выражено. Однако в группе



с имплантированием прогениторных клеток в гидрогеле высокомолекулярной ГК наблюдается попытка восстановления структуры ткани мозга.

**Заключение.** Трансплантация аутологических нейральных прогениторных клеток обонятельной выстилки мышей линии C57BL/6 в гидрогеле на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты в очаг повреждения после открытой травмы мозга способствует функциональному восстановлению рефлекторной и когнитивной деятельности животных в посттравматическом периоде.

**Финансирование исследования.** Работа поддержана Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (проект №RFMEFI60715X0117).

**Конфликт интересов** не заявляется.

#### Литература/References

1. Гусев Е.И., Коновалов А.Н., Скворцова В.И., Гехт А.Б. Неврология. М: ГЭОТАР-Медиа; 2009; 1040 с. Gusev E.I., Kononov A.N., Skvortsova V.I., Gekht A.B. *Nevrologiya* [Neurology]. Moscow: GEOTAR-Media; 2009; 1040 p.
2. Bullock M.R., Chesnut R., Ghajar J., Gordon D., Hartl R., Newell D.W., Servadei F., Walters B.C., Wilberger J.E. Guidelines for the surgical management of traumatic brain injury author group. *Neurosurgery* 2006; 58(3): S2–Vi, <https://doi.org/10.1093/neurosurgery/58.3.vi>.
3. Mayo Clinic Staff. Treatments and drugs. In: *Traumatic brain injury*. Mayo Clinic; 2014. URL: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/traumatic-brain-injury/basics/treatment/con-20029302>.
4. Dobrowski S., Lepski G. Stem cells in traumatic brain injury. *Am J Neurosci* 2013; 4(1): 13–24, <https://doi.org/10.3844/amjnsp.2013.13.24>.
5. Crompton K.E., Goud J.D., Bellamkonda R.V., Gengenbach T.R., Finkelstein D.I., Horne M.K., Forsythe J.S. Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28(3): 441–449, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.044>.
6. Tate C.C., Shear D.A., Tate M.C., Archer D.R., Stein D.G., LaPlaca M.C. Laminin and fibronectin scaffolds enhance neural stem cell transplantation into the injured brain. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3(3): 208–217, <https://doi.org/10.1002/term.154>.
7. Mo L., Yang Z., Zhang A., Li X. The repair of the injured adult rat hippocampus with NT-3-chitosan carriers. *Biomaterials* 2010; 31(8): 2184–2192, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.078>.
8. Cao Z. *Developing chitosan-based biomaterials for brain repair and neuroprosthetics*. Master's Thesis. University of Tennessee; 2010. URL: [http://trace.tennessee.edu/utk\\_gradthes/609/](http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/609/).
9. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126(4): 677–689, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
10. Liao H., Munoz-Pinto D., Qu X., Hou Y., Grunlan M.A., Hahn M.S. Influence of hydrogel mechanical properties and mesh size on vocal fold fibroblast extracellular matrix

production and phenotype. *Acta Biomater* 2008; 4(5): 1161–1171, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.04.013>.

11. Wlodarczyk J., Mukhina I., Kaczmarek L., Dityatev A. Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. *Dev Neurobiol* 2011; 71(11): 1040–1053, <https://doi.org/10.1002/dneu.20958>.

12. Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E., Perminova M., Pimashkin A., Zakharov Y., Dityatev A., Mukhina I. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 149, <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00149>.

13. Balyabin A.V., Tikhobrazova O.P., Muravyeva M.S., Klyuev E.A., Ponyatovskaya A.V., Shirokova O.M., Bardakova K.N., Minaev N.V., Koroleva A.V., Mitaeva Y.I., Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Rochev Y.A., Chichkov B.N., Timashev P.S., Bagratashvili V.N., Mukhina I.V. Long-term neurological and behavioral results of biodegradable scaffold implantation in mice brain. *Sovremennye tehnologii v medicene* 2016; 8(4): 198–211, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.25>.

14. Feeney D.M., Boyeson M.G., Linn R.T., Murray H.M., Dail W.G. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 1981; 211(1): 67–77, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90067-6).

15. Beni-Adani L., Gozes I., Cohen Y., Assaf Y., Steingart R.A., Brennehan D.E., Eizenberg O., Trembovler V., Shohami E. A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296(1): 57–63.

16. Levy A., Bercovich-Kinori A., Alexandrovich A.G., Tsenter J., Trembovler V., Lund F.E., Shohami E., Stein R., Mayo L. CD38 facilitates recovery from traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2009; 26(9): 1521–1533, <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0746>.

17. Beni-Adani L., Eizenberg O., Cohen Y. Correlation between neurological severity score and T2-weighted MRI in head injured mice. *Rest Neurol Neurosci* 2000; 16(3–4): 242.

18. Tsenter J., Beni-Adani L., Assaf Y., Alexandrovich A.G., Trembovler V., Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma* 2008; 25(4): 324–333, <https://doi.org/10.1089/neu.2007.0452>.

19. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М: Высшая школа; 1991; 399 с. Bures J., Bureshova O., Huston J.P. *Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya* [Techniques and basic experiments on the study of the brain and behavior]. Moscow: Vysshaya shkola; 1991; 399 p.

20. Huang T.N., Chuang H.C., Chou W.H., Chen C.Y., Wang H.F., Chou S.J., Hsueh Y.P. Tbr1 haploinsufficiency impairs amygdalar axonal projections and results in cognitive abnormality. *Nat Neurosci* 2014; 17(2): 240–247, <https://doi.org/10.1038/nn.3626>.

21. Moscardo E., Salvetti B., Becchi S., Bertini G., Fabene P.F. The novel object recognition test in rodents: which are the essential methodological aspects? In: *Proceedings of Measuring Behavior 2012, 8 th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research*. Spink A.J., Grieco F., Krips O.E., Loijens L.W.S., Noldus L.P.J.J., Zimmerman P.H. *Noldus Information Technology* 2012; p. 476–478.